

基因组编辑产品的安全管理

闫元元^{1,2}, 朱金洁¹, 谢传晓¹, 刘昌林¹

1 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

2 四川农业大学 玉米研究所, 四川 成都 610000

闫元元, 朱金洁, 谢传晓, 等. 基因组编辑产品的安全管理. 生物工程学报, 2019, 35(6): 921–930.

Yan YY, Zhu JJ, Xie CX, et al. Regulatory framework of genome-edited products – a review. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 921–930.

摘 要: 基因组编辑技术是指利用特异性核酸酶的定点剪切活性与细胞内源 DNA 损伤修复活性, 在基因组水平上对目的核酸序列或单个核苷酸进行定点修饰的基因工程技术, 该技术可以对生物体基因组进行精确敲除、插入、单碱基突变或置换等编辑。目前, 基因组编辑技术具有精确性、高效性及易操作性, 应用范围日益扩大。文中简要概述了 3 种主要的基因组编辑技术工具及基因组编辑类型, 介绍了美国、欧盟等国家和地区对基因组编辑产品的监管体制。同时, 基于我国对转基因产品的安全管理原则与体系, 初步提出了基因组编辑产品的安全管理思路。根据中间材料或产品中是否含有外源编辑酶蛋白基因成分对基因组编辑产品进行分类管理, 含有外源编辑酶的材料应按现有转基因安全管理办法进行管理; 中间材料或产品中不含有 Cas9 等编辑酶的材料应根据被编辑位点的特征进行具体分类管理。

关键词: 基因组编辑, 转基因, 安全管理

Regulatory framework of genome-edited products – a review

Yuanyuan Yan^{1,2}, Jinjie Zhu¹, Chuanxiao Xie¹, and Changlin Liu¹

1 Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 610000, Sichuan, China

Abstract: Genome editing is a genetic engineering technique that uses site-directed cleavage activity of specific artificial nucleases and endogenous DNA damage repair activity to generate insertions, deletions or substitutions in the targeted genomic loci. As the accuracy and efficiency of genome editing is improving and the operation is simple, the application of genome editing is expanding. This article provides an overview of the three major genome editing technologies and genome editing types, and the regulatory frameworks for genome-edited products were summarized in the United States, the European Union, and other countries. At the same time, based on the Chinese safety management principles and systems for genetically modified organisms (GMOs), the authors proposed a regulatory framework for genome-edited products. Genome-edited products should first be classified according to whether containing exogenous genetic components such as Cas9 editing enzymes or not. They should be regulated as traditional genetically modified organisms if they do. Otherwise, the regulation of genome-edited products depends on targeted modifications.

Keywords: genome editing, transgene, safety regulation

Received: October 12, 2018; **Accepted:** January 30, 2019

Supported by: National Transgenic Major Project of China (No. 2016ZX08011003).

Corresponding author: Changlin Liu. Tel: +86-10-82107464; Fax: +86-10-82106748; E-mail: liuchanglin@caas.cn

转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2016ZX08011003) 资助。

基因组编辑技术是指对基因组进行定点修饰的技术,该技术可以对生物体基因组进行精确敲除、插入或置换,其中 CRISPR/Cas9 系统最为突出,CRISPR/Cas9 自 2013 年被 *Science* 列为年度十大科学突破之一后,始终保持高速发展,在医药治疗、农业生产和环境保护等方面均具有巨大的应用潜力,是当前生物技术的热点与未来的发展方向。虽然基因组编辑技术有很高的精确性,但也存在一定程度的脱靶现象。目前,亟需明确基因组编辑产品的安全管理思路 and 办法,保障基因组编辑技术及其产业的健康有序发展。

1 基因组编辑技术

基因组编辑是一种对生物体基因组进行定点修饰、定向敲除或插入目的基因的编辑技术^[1]。该技术通过精确定位基因组的目标位点,剪断靶标 DNA 片段,实现插入、敲除或定点修改目标序列。通过基因组编辑,特定敲除目标基因、插入特定基因或者定点突变使基因失活,可以最直接有效地研究该基因功能以及它对各方面性状的影响。基因组编辑技术主要包括核酸酶介导的锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFN) 技术、转录激活因子样效应物核酸酶 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 技术和 RNA 引导的规律成簇间隔短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 技术。

ZFN 是第一个针对特定 DNA 区段可编程的基因组编辑工具,由特异性 DNA 结合结构域 ZFP 和 DNA 切割结构域 *Fok I* 核酸内切酶组成。由于结构域 ZFP 能对基因组中特异性基因进行识别和定点剪切,导致基因 DNA 产生双链断裂 (Double strand break, DSB),再通过非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组 (Homology directed repair, HDR) 修复断

裂,从而对基因组中的特定位点进行靶向编辑^[2-3]。然而,ZFN 的设计比较繁琐,靶向新的 DNA 序列时需要定制设计新的 ZFN,存在脱靶率高、成本较高和难以使用等缺点。

TALEN 也是一种核酸酶介导的基因组编辑技术,由 TALE 和 *Fok I* 核酸内切酶两部分组成。其中,TALE 结构域能识别 DNA 特异位点并与之结合,而由 *Fok I* 构成的切割域能执行切割功能。两者结合可使靶位点目标基因 DNA 产生 DSB,进一步诱导 DNA 损伤后修复,对基因组进行靶向编辑^[4]。虽然在易用性方面优于 ZFN,但其蛋白质设计、合成和验证工作限制了其广泛应用。

ZFN 和 TALEN 的序列靶向通过蛋白质-DNA 相互作用介导,而 CRISPR/Cas 系统募集指导 RNA,通过碱基配对将核酸内切酶引导至靶 DNA 序列。CRISPR/Cas 系统大致分为 3 类,其中 II 型系统的组成比较简单,只需要 Cas9 蛋白、tracrRNA 和 crRNA 三种成分即可发挥作用^[5],且具有高效性和易操作性,成为目前应用最广泛的基因组编辑系统。II 型 CRISPR/Cas 系统的特征蛋白为 Cas9, Cas9 蛋白具有 RuvC 和 HNH 两个核酸酶结构域,负责切割靶 DNA 的两条链,而造成双链的断裂。其中 HNH 结构域负责切割与 crRNA 互补的 DNA 链,切割位点位于原型间隔序列毗邻基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 上游 3 bp 处, RuvC 结构域负责切割非互补链,切割位点位于 PAM 上游 3-8 bp 处。Cas9 蛋白同时具有加工产生 crRNA 以及切割外源核酸的功能^[6]。crRNA 通过碱基配对与 tracrRNA 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物,研究者可以将 tracrRNA 和 crRNA 作为两种向导 RNA (gRNA) 或者融合在一起形成单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)。sgRNA 能够与 Cas9 核酸内切酶结合并将 Cas9 引导至基因组上对靶位点进行切

割。CRISPR/Cas9 系统使目标基因 DNA 产生 DSB, 特异性 DSB 会激活细胞内的 DNA 损伤修复机制, 包括易错的 NHEJ 修复和高保真的 HDR 修复。目前, CRISPR/Cas9 系统已经被成功运用到玉米 *Zea mays*^[7]、小麦 *Triticum aestivum*^[8]、水稻^[9]、大豆 *Glycine max*^[10]、烟草 *Nicotiana tabacum*^[11] 和拟南芥^[12] 等植物中, 与其他编辑技术相比, 其成本低、制作简便、快捷高效的优点, 成为科研、医疗等领域的有效工具。

2 基因组编辑的类型

2.1 单碱基替换

单碱基变异是作物许多重要农艺性状发生突变的遗传基础, 常导致氨基酸的替换或蛋白质翻译终止, 使基因功能发生改变, 从而产生新性状。2016 年 4 月, 哈佛大学 David Liu 首先报道了基于胞嘧啶脱氨酶 (APOBEC1) 与 CRISPR/Cas9 融合形成的单碱基编辑技术 (Base editor, BE)。该技术将 Cas9 与胞嘧啶脱氨酶融合, 并通过 sgRNA 将融合蛋白靶向靶位点, 在不切割双链 DNA 的情况下, 在一定的突变窗口内对靶基因位点实现胞嘧啶 (Cytosine, C) 到胸腺嘧啶 (Thymine, T) 的单碱基转换^[13], 研发了第一代编辑系统 (BE1), 但效率不高。在此基础上, 他们通过融合尿嘧啶糖苷酶抑制蛋白 (Uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI) 形成了第二代编辑系统 (BE2), 同时将 dCas9 突变为 Cas9n (D10A), 进一步优化产生了 BE3。2017 年 8 月, David Liu 实验室又在 BE3 基础上通过进一步优化连接 (Linker) 序列, 同时增加一个拷贝的 UGI, 形成了 BE4 系统^[14]。其中他们实验室报道的 BE3 效率最高。同年 11 月, Li 等^[15] 首先利用 BE3 系统构建植物表达载体, 以水稻 *OsPDS* 和 *OsSBEIIb* 为靶标基因进行单个碱基定点替换研究, 效率最高可达 20% 左右。中国科学院高彩霞研究组也随后报道了借鉴哺乳动物单

碱基编辑方法, 利用改造后的 Cas9 蛋白 (nCas9-D10A) 融合大鼠胞嘧啶脱氨酶 (rAPOBEC1) 和 UGI, 构成了高效的植物单碱基编辑系统 nCas9-PBE, 成功在小麦、水稻和玉米三大重要农作物基因组中实现高效、精确的单碱基定点突变^[16]。同时, 朱健康研究组在 APOBEC1 功能的基础上, 对两个编码重要农艺性状的水稻基因 *NRT1.1B* 和 *SLR1* 进行 C→T 或 C→G 的单碱基编辑, 替换的效率为 1.4%–11.5%^[17]。

为了将单碱基编辑系统更好地应用于研究中, 2017 年 10 月, David Liu 又报道了可通过将腺苷脱氨酶与 Cas9 融合实现腺嘌呤 (A) 到鸟嘌呤 (G) 转换的单碱基编辑系统 (Adenine base editor, ABE)。该系统可将 PAM (NGG) 上游 12–17 bp 处的腺嘌呤脱氨基转变为肌苷, 肌苷可与 C 配对, 在 DNA 水平被当成 G 进行识别与复制, 实现在突变窗口内 A 到 G 的突变。研究者经过多次筛选, 构建了在人类细胞中编辑效率可达 50% 左右的高精确度的单碱基编辑系统^[18]。2018 年 2 月, 朱健康研究组通过 ABE 单碱基编辑系统成功地对水稻基因组中的 *OsSPL14* 和 *SLR1* 位点进行了单碱基编辑, A·T 到 G·C 的替换的效率分别为 26% 和 12.5%^[19]。同年 5 月, 高彩霞研究组在前期研究的基础上, 利用 nCas9-D10A 融合大肠杆菌野生型腺嘌呤脱氨酶 (ecTadA) 和人工定向进化的腺嘌呤脱氨酶 (ecTadA*) 二聚体, 建立了 ABE 单碱基编辑系统, 在水稻和小麦中实现了高效的 A·T 到 G·C 碱基的替换, 并获得了通过植物 ABE 系统编辑的具有除草剂抗性的水稻和小麦植株^[20]。随后, 韩国科技大学的 Jin-Soo Kim 团队也成功实现了拟南芥和油菜 *Brassica napus* L. 基因组 A→G 的碱基替换, 这将为植物基因组编辑提供更多的工具选择^[21]。单碱基编辑系统在植物中的成功利用, 有望大大加快农作物重要农艺性状的改良进程, 具有重要的应用前景。

2.2 寡核苷酸插入或缺失

CRISPR/Cas9 系统使目标基因 DNA 产生 DSB, 特异性 DSB 会激活细胞内的 DNA 损伤修复机制, 由非同源末端连接 (NHEJ) 介导的修复过程通常会导致非特异性的插入、缺失或其他突变。2016 年, 朱健康课题组利用 CRISPR/Cas9 技术在两个广泛种植的优良粳稻品种秀水 134 和 9522 中将 *Waxy* 基因进行突变。研究表明, *Waxy* 基因的突变会导致这两个品种中的直链淀粉含量降低, 将非糯稻变成糯稻^[22]。2017 年, 谢传晓课题组利用 CRISPR/Cas9 编辑技术, 对玉米 *LG1 (LIGULELESS1)* 基因第 1 外显子序列进行定向突变, 产生基因敲除突变, 获得了叶片夹角表型减小的突变植株^[23]。

2.3 多位点编辑

基于转录后 gRNA 和 Cas9 是分离的, 各个 gRNA 具有独立性的特点, CRISPR/Cas9 系统可在同一个体中实现多基因或多位点同时敲除。多位点编辑可提高复杂数量性状基因功能研究的效率, 构建多基因缺失突变体, 有利于功能冗余的家族基因研究和多倍体物种的研究。通过高效驱动多个 gRNAs, 可以实现作物重要农艺性状的遗传改良。

2015 年, 刘耀光课题组构建的 CRISPR/Cas9 载体系统可以在单子叶植物和双子叶植物中实现高效的多重基因组编辑, 利用该系统, 研究人员在水稻中分别编辑了 46 个靶位点, 突变率平均为 85.4%^[24]。2017 年, 侯文胜课题组利用 CRISPR/Cas9 系统编辑大豆开花调控途径中 3 个关键的整合因子 *GmFT2a*, 介导产生提前终止密码子引起 mRNA 降解, 最终筛选获得了“无外源基因 (Transgene-clean)”的 *GmFT2a* 定点敲除晚花突变体, 这类突变体不含有转基因元件, 表型显著且能稳定遗传^[25]。该研究利用 CRISPR/Cas9 系统实现大豆重要农艺性状遗传改良, 为大豆基因组编

辑技术的育种应用提供了成功例子。2018 年, 堪萨斯州立大学的科研人员针对小麦粒长、粒宽和粒重等有关的 *TaGW2* 基因和与小麦白粉病等有关的 *TaLpx-1*、*TaMLO* 基因, 利用串联重复的 tRNA-gRNA 单元构建的编辑载体, 成功实现了六倍体小麦 3 个基因的同时敲除^[26]。

2.4 CRISPR/Cas 系统介导的大片段编辑

随着基因组编辑技术的不断发展, 除了通过引入寡核苷酸插入缺失变异来敲除基因功能外, CRISPR/Cas9 还可以用来创建染色体异常 (如大片段缺失、易位、倒位) 的突变体。Zhou 等^[27]利用 CRISPR/Cas9 和一对 gRNA 从水稻染色体上删除了 1 个 115–245 kb 大片段, 其中包含了 2–3 个不同的基因簇, 且该突变被稳定地遗传到所有 T2 代植株。由于此技术在引起 DSB 和随后的靶基因组编辑方面达到极高的效率, 一些 T0 植物可以直接用于生物实验, 减少基础生物学实验所需的时间。

粳稻中的 *DEP1 (DENSE AND ERECT PANICLE1)* 突变基因, 能促进细胞分裂, 使得植株稻穗变密、枝梗数增加和每穗籽粒数增多, 从而促使水稻增产。为了使籼稻增产, 先正达生物科技 (中国) 有限公司的研发人员利用 CRISPR/Cas9 技术对籼稻中的 *DEP1* 基因进行了突变, 研究表明他们成功造成了 *DEP1* 基因上 10 kb 大片段的缺失, 且编辑效率超过 9%, 并得到了具有增产潜力的编辑后水稻材料^[28]。

朱健康研究组对 2 个编码拟南芥甲基化酶的内源基因 *ROS1* 和 *DME* 分别进行了 4 个外源大片段敲入测试, 其中在 *ROS1* 蛋白 C 端分别敲入 720 bp 的绿色荧光蛋白 GFP 和长达 1 653 bp 的荧光素酶蛋白 LUC, 测试均获得稳定可遗传的单株, 它可以在拟南芥基因组精准定向地实现氨基酸或大片段的插入或替换, 效率高达 5%–10%^[29]。

2.5 CRISPR/Cas 系统介导的转录调控

研究者将 CRISPR-Cas9 系统中 Cas9 蛋白的两个核酸内切酶活性的结构域 HNH 和 RuvC 进行 H840A 和 D10A 定点突变, 获得只有 DNA 结合能力的蛋白 dCas9, 使该系统具有了调控基因表达的新功能^[30]。

2013 年, 加州大学旧金山分校的研究人员发现 CRISPR 技术可以用于真核细胞转录调控研究, 并在人类和酵母细胞中均得到证实^[31]。2015 年, Lowder 等^[32]将 dCas9 与病毒转录激活因子 Vp64 融合, 通过拟南芥的瞬时表达, 表明 dCas9-Vp64 成功地激活了 *GUS* 基因的表达。为了提高转录激活效率, Konermann 等^[33]重新设计了 CRISPR/dCas9 激活复合体, 使之可以大幅度提高转录激活效率, 在人类细胞中实现同时激活 10 个内源基因, 并能够上调长链非编码 RNA (lncRNA) 的转录水平。Baazim 等^[34]则在烟草的瞬时转化中采用 CRISPR/dCas9 系统, 将 dCas9 的 C-末端与激活结构域 EDLL 或 TAD 融合, 结果表明 dCas9-EDLL 融合蛋白或 dCas9-TAD 融合蛋白可以激活 *GUS* 基因或 *PDS* 基因的表达。同时, 该团队将 dCas9 的 C-末端与转录抑制区域 SRDX 融合, 证明 dCas9-SRDX 融合蛋白可以抑制 *PDS* 基因的表达。

3 基因组编辑产品的安全管理

以 CRISPR/Cas9 为代表的基因组编辑技术是近年来发展的新技术, 世界各国还没有明确的、针对性的法律法规, 目前全球各国对于基因组编辑产品的安全性及其监管政策仍然处于形成的过程中, 不同国家关于基因组编辑产品的政策存在很大差别。

3.1 国外监管体制

目前对于基因组编辑产品的监管尚未达成全球共识, 作为全球转基因作物第一种植大国, 美

国的监管原则侧重于管理转基因技术的产品, 而不是研发、生产过程, 在确保公共安全的同时, 也不会因过于严苛的管理而妨碍技术发展。食品药品监督管理局对于基因组编辑产品的审查则是根据适用于各个类型产品的具体法规, 维持以产品为中心、以科学为基础的监管政策, 同时遵循美国政府总体的政策原则^[35]。而美国环境保护署则认为, 如果应用基因组编辑技术赋予作物抗虫抗病特性, 则需要进行个案分析。2018 年, 美国农业部发表声明, 表示不会对一些未利用植物害虫的新技术培育的农作物进行监管, 其中包括基因组编辑技术, 在 9 月份该机构表示, 它不会对营养质量改善的 TALEN 编辑的苜蓿品种进行管理。美国的 Calyxt 公司拥有 6 种不受管制的 TALEN 编辑作物^[36]。

阿根廷 2015 年的政策建立了个案分析的咨询程序, 以确定产品是否属于转基因生物法规的监管范围。申请人有两种选择, 第一种适用于仍处于设计阶段的项目。申请人提交初步咨询, 目标是预测假设的预期产品是否属于转基因生物, 在此情况下, 政府评估部分基于开发人员的期望, 只具有初步状态。当最终获得新作物时, 申请人必须返回监管机构并提交关于实际产生的遗传修饰的事实确定。只有在产品具有初步调查中预期的功能的情况下, 才会保留早期关于其监管状态的评估。第二种是按照现行对 GMO 申请的要求提交完整的申报书, 申请人应提交详细数据, 以确定育种过程的结果是否是遗传物质的新组合, 该程序为 60 个工作日的时间限制。如果最终植物不含有由基因编辑技术引入的外源 DNA, 将不受监管^[37]。

加拿大和阿根廷一样被认为有基于产品的法规。其生物技术监管框架可追溯至 1993 年, 基于新性状植物 (PNT) 触发监管机制。加拿大的监管机制对于传统的基因突变产品或基因编辑产品,

不论产品开发技术如何,仅针对于产品在食用和环境等方面是否有新性状进行监管^[37]。日本则认为如果证实最终产品中不含有转基因成分,该产品则被认为与传统突变育种所得的产品相同。然而,对于目标基因不够明确时,研发者应该提前向监管机构提供相关信息,必要时接受来自专家的科学评估^[38]。

新西兰采用严格的过程驱动的监管框架即1996年的有害物质和新生物(HSNO)法案来管制转基因生物。2012年,Scion根据其中第26条,要求环境保护局(EPA)决定,有机体是否在新西兰受到GM的监管^[39]。2013年,EPA认为Scion提出的非转基因基因编辑方法与化学诱变和遗传操作具有相似性,在编辑过的植物中没有外来DNA,因此通过基因编辑方法生产的植物,不会被视作转基因生物^[40],然而美国环保署对此提出上诉,高等法院最终裁定认为基因编辑产品仍然需要像传统转基因产品一样接受复杂的监管^[41]。

欧盟历来对转基因产品持相对保守的态度。2013年,在欧盟主管部门的要求下,针对不能确定产物是否为转基因的生物技术,设立了新技术工作组;随后,欧盟委员会要求转基因作物需通过欧盟指令2001/18/EC(2001)和EC法规258/97(1997)的详细程序进行监管审查,这些被认为是基于过程的转基因生物法规^[42-44]。2018年7月,欧盟最高法院通过了一项决议,要求基因组编辑作物必须接受与传统转基因作物同样严格的监管^[45]。

3.2 我国对基因组编辑产品的安全管理观点

近年来,基因组编辑技术发展迅速,使基因精准修饰成为现实,在农业生产、医药治疗和环境保护等领域具有巨大的应用潜力。2016年李家洋院士等提出了基因组编辑技术的管理框架,包括以下5项要点:1)各试验环节应该在隔离的密闭环境中进行,尽可能防止材料传播到外界;2)

如果在产品前期引入Cas核酸酶等外源DNA,必须确保最终产品中不含有外源基因;3)记录目标基因的靶位点处DNA序列变化,如果引入外源DNA,必须注明供体和受体的亲缘关系,如果亲缘关系很远,则根据具体情况具体分析;4)通过全基因组测序记录基因组编辑引起的除靶位点外的所有序列变化,分析脱靶效应防止产生预期之外的编辑;5)申请中咨询者应该详细说明以上4点。满足上述5个基本条件时,基因组编辑产品可以按照常规育种品种对待,不需要进行监管^[46]。

3.3 基因组编辑产品的分类管理

近年来基因组编辑技术不断创新,已在植物基因功能研究、作物育种等领域广泛应用,特别是RNA介导的CRISPR/Cas9基因组编辑技术,已被广泛应用于培育具有优良性状的基因组编辑大豆、大麦、蘑菇和玉米等产品。随着基因组编辑作物不断从实验室走向田间,围绕着基因组编辑作物的安全评价和监管态度也成为急需解决的问题。

综合国际国内已有政策和观点,作者认为基因组编辑作物应根据中间材料或产品基因组中是否含有外源编辑酶蛋白等转基因成分进行分类管理。含有外源编辑酶蛋白的材料,与传统转基因产品管理方法应一致;中间材料或产品基因组中不含有Cas9编辑酶等转基因成分,该类材料应根据被编辑位点的特征再次进行分类管理。

3.3.1 含有Cas9编辑酶等转基因成分的产品安全管理

含有Cas9等编辑酶的产品管理方法应与传统转基因产品管理方法一致^[33-35],即参照首先根据植物、动物和微生物分类别,然后根据受体生物和转基因操作的安全性分等级,再结合试验研究、中间试验、环境释放、生产性试验和生产应用安全证书等进行分阶段,并按照个案分析的原

则进行管理。

3.3.2 不含有 Cas9 等编辑酶的产品管理

对于不含有 Cas9 等编辑酶的基因组编辑产品应根据被编辑位点的不同进行分类管理。通过 CRISPR/Cas9 技术可以实现基因的定点编辑,被定点编辑的基因可以稳定遗传到下一代,不影响其他性状又无外源基因的表达,这与传统的杂交作物本质上没有区别。因编辑位点和 CRISPR/Cas9 载体整合位点常位于不同染色体,通过后代自交或与野生型杂交,可分离获得不含有任何转基因痕迹(去除 CRISPR/Cas9)的定点改造突变体。张毅等^[47]在小麦中报道了无转基因成分的基因组编辑,建立了一种新的通过瞬时表达 CRISPR/Cas9 而高效突变目标基因的技术,获得了无外源基因整合、具有育种应用价值的后代材料。2016年,杜邦先锋公司将 CRISPR/Cas9 蛋白和 gRNA 在体外组装成核糖核蛋白复合体(RNP),再利用基因枪转化玉米未成熟胚细胞,得到全程无 DNA 载体的叶舌缺失型玉米^[48]。中国农业科学院作物科学研究所通过 CRISPR/Cas9 系统介导的同源重组和后代分离,获得了不含有任何转基因片段的抗除草剂水稻^[49]。2017年,高彩霞等^[50]将 CRISPR/Cas9 蛋白和 gRNA 在体外组装成核糖核蛋白复合体,利用基因枪法将 CRISPR/Cas9 RNP 转入小麦细胞中,成功地在小麦中建立了全程无外源 DNA 的基因组编辑体系。同年10月,冷泉港实验室的番茄育种家利用 CRISPR/Cas9 体系,通过定点修饰顺式调控序列实现了对番茄数量性状的精准操控,这种新创制的顺式调控序列等位变异能够在非转基因后代中得到固定^[51]。

单碱基编辑或寡核苷酸插入缺失的基因组编辑产品没有引入外源基因,因此不会产生新的蛋白,它们只是突变植物本身的基因,而且更为精确,所以本质上与传统的诱变育种一样,对于这类产品应该简单审查或备案,不需要接受严格的

监管。但同时适当考虑脱靶效应,在植物中可以通过全基因组测序分析脱靶效应,也可以通过回交转育减轻脱靶效应。2016年,宾夕法尼亚大学的杨亦农利用 CRISPR/Cas9 编辑技术获得了抗褐变白色双孢菇,该产品不需要通过法规机构的监管程序,直接进行种植和销售,与基因工程不同的是,这类蘑菇通过删除目标基因中几个碱基实现,没有外源 DNA 残留,这是第一例得到美国政府上市许可的 CRISPR 基因组编辑生物^[52]。最近,美国农业部又豁免了一系列基因编辑产品^[36]。

定点引入外源基因的基因组编辑产品应该按照传统转基因产品的管理,因为引入外源基因后会产生新的蛋白,在一定程度上和传统转基因的本质一样。目前,科学家已经实现利用基因组编辑技术定点插入大片段 DNA。例如,2009年,Shukla 等^[53]利用 ZFN 技术将一种抗除草剂基因导入玉米基因组的靶位点,破坏玉米中的 *ZmIPK1*,获得了抗除草剂和肌醇六磷酸水平降低的植株,替换效率达 10%,可稳定遗传,该方法可应用于玉米基因组中 ≥ 1 kb 的任何基因座。2014年,朱健康研究组对 2 个编码拟南芥甲基化酶的内源基因 *ROS1* 和 *DME* 分别进行了 4 个外源大片段敲入测试,其中在 *ROS1* 蛋白 C 端分别敲入 720 bp 的绿色荧光蛋白 GFP 和长达 1 653 bp 的荧光素酶蛋白 LUC,测试均分别获得了稳定可遗传的单株系^[27]。

4 结论

基因组编辑产品是一种新兴事物,随着基因组编辑技术的研发,基因组编辑产品日益丰富,在农业、医药和环境保护等领域具有重要应用价值。基因组编辑产品的监管急需解决,法律法规无疑是人类控制和应对基因组编辑产品安全风险的重要手段,但各国对基因组编辑产品的态度存在较大差异。综合国内国际的观点和政策,作者认为对基因组编辑产品的安全管理,应在科学的

基础上, 根据基因组编辑产品的特征进行分类管理, 既要考虑基因组编辑产品的安全性, 又不能阻碍基因组编辑技术及其产业的发展。

REFERENCES

- [1] Liu YB, Xu X, Cao SH, et al. Research progresses in gene editing techniques. *Biotechnol Bull*, 2017, 33(6): 39–44 (in Chinese).
刘玉彪, 许馨, 曹山虎, 等. 基因编辑技术最新研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(6): 39–44.
- [2] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292.
- [3] Orlando SJ, Santiago Y, Dekelver RC, et al. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(15): e152–e152.
- [4] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761.
- [5] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
- [6] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [7] Zhu JJ. Targeted genome editing in maize using CRISPR-Cas9[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015 (in Chinese).
朱金洁. CRISPR-Cas9 介导的玉米基因组定点编辑研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [8] Shan QW, Wang YP, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688.
- [9] Meng XB, Yu H, Zhang Y, et al. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. *Mol Plant*, 2017, 10(9): 1238–1241.
- [10] Sun XJ, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 10342.
- [11] Nie MY, Gao JP, Luo P, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis and function analysis of DXR in *Nicotiana tabacum*. *Tobacco Sci Tech*, 2016, 49(6): 1–7 (in Chinese).
聂梦云, 高军平, 罗培, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的烟草 *NtDXR* 基因敲除及功能分析. *烟草科技*, 2016, 49(6): 1–7.
- [12] Zhang T, Zheng Q, Yi X, et al. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant Biol Journal*, 2018, 16(8): 1415–1423.
- [13] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [14] Komor AC, Zhao KT, Packer MS, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv*, 2017, 3(8): eaao4774.
- [15] Li J, Sun Y, Du J, et al. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(3): 526–529.
- [16] Yuan Z, Wang YP, Chao L, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438–440.
- [17] Lu YM, Zhu JK. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(3): 523–525.
- [18] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471.
- [19] Kai H, Tao XP, Yuan FT, et al. Precise A•T to G•C base editing in the rice genome. *Mol Plant*, 2018,

- 11(4): 627–630.
- [20] Chao L, Yuan Z, Wang YP, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 59.
- [21] Kim JS. Precision genome engineering through adenine and cytosine base editing. *Nat Plants*, 2018, 4(3): 148–150.
- [22] Zhang J, Zhang H, Botella JR, et al. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. *J Integr Plant Biol*, 2018, 60(5): 369–375.
- [23] Li CX, Liu CL, Qi XT, et al. RNA-guided Cas9 as an *in vivo* desired-target mutator in maize. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(12): 1566–1576.
- [24] Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284.
- [25] Cai Y, Li C, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol J*, 2017, 16(1): 176–185.
- [26] Wang W, Pan Q, He F, et al. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *CRISPR J*, 2018, 1(1): 65–74.
- [27] Zhou HB, Bo L, Weeks DP, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): 10903–10914.
- [28] Wang Y, Geng LZ, Yuan ML, et al. Deletion of a target gene in *Indica* rice via CRISPR/Cas9. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(8): 1333–1343.
- [29] Miki D, Zhang WX, Zeng WJ, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1967.
- [30] Luo W, Gu H. The state of the art of CRISPR-dCas9 system on regulating level of gene expression. *Res Explorat Lab*, 2016, 35(3): 20–23 (in Chinese).
- 罗旻, 顾华. CRISPR-dCas9 系统在基因表达调控中的最新研究进展. *实验室研究与探索*, 2016, 35(3): 20–23.
- [31] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451.
- [32] Lowder LG, Zhang DW, Baltes NJ, et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 971–985.
- [33] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583–588.
- [34] Baazim H. RNA-guided transcriptional regulation in plants via dCas9 chimeric proteins. *Bioscience*, 2014, doi: <http://dx.doi.org/10.25781/KAUST-356X6>.
- [35] Kuzma J. Policy: reboot the debate on genetic engineering. *Nature News*, 2016, 531(7593): 165.
- [36] Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(1): 6–7.
- [37] Whelan AI, Lema MA. Regulatory framework for gene editing and other new breeding techniques (NBTs) in Argentina. *GM Crops Food*, 2015, 6(4): 253–265.
- [38] Ishii T, Araki M. A future scenario of the global regulatory landscape regarding genome-edited crops. *GM Crops & Food*, 2017, 8(1): 44–56.
- [39] Kershen DL. Sustainability council of New Zealand Trust v. the environmental protection authority: gene editing technologies and the law. *GM Crops Food*, 2015, 6(4): 216–222.
- [40] Environmental Protection Authority (2013). Decision[EB/OL]. [2018-07-03]. <https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsno-ar/APP201381/APP201381-APP201381-Decision.pdf>.
- [41] Fritsche S, Poovaiah C, Macrae E, et al. A New Zealand perspective on the application and regulation of gene editing. *Front Plant Sci*, 2018, 9:

- 1323.
- [42] Araki M, Ishii T. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(3): 145–149, doi: 10.1016/j.tplants.2015.01.010.
- [43] Araki M, Nojima K, Ishii T. Caution required for handling genome editing technology. *Trends Biotechnol* 2014 32(5): 234–237, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.03.005.
- [44] Sprink T, Eriksson D, Schiemann J, et al. Regulatory hurdles for genome editing: process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(7): 1493–506, doi: 10.1007/s00299-016-1990-2.
- [45] Callaway E. CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. *Nature*, 2018, 560(7716): 16.
- [46] Huang SW, Weigel D, Beachy RN, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nat Genetics*, 2016, 48(2): 109–111.
- [47] Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun*, 2016, 7: 12617.
- [48] Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, et al. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2016, 7: 13274.
- [49] Sun YW, Xin Z, Wu CY, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol Plant*, 2016, 9(4): 628–631.
- [50] Liang Z, Chen KL, Zhang Y, et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins. *Nat Protocols*, 2018, 13(3): 413–430.
- [51] Rodríguez-Leal, Daniel, Lemmon ZH, Man J, et al. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*, 2017, 171(2): 470–480.e8.
- [52] Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 2016, 532(7599): 293.
- [53] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 437–441.

(本文责编 郝丽芳)